

新布尼亚病毒真核表达载体的构建及表达

窦丽丽,陶晓莉,王晓芳,李婷婷,李永刚

摘要:目的 探究 SFTSV-NSs 基因的结构和功能以及病毒在感染细胞过程中与宿主的相互作用,通过构建 SFTSV-NSs 真核表达载体 SFTSV-NSs-FLAG,并将其转染进 293 细胞内,为进一步研究 SFTSV-NSs 基因的结构和功能奠定基础。**方法** 利用 RT-PCR 扩增 SFTSV-NSs 基因序列并测序,并将纯化得到的 SFTSV-NSs cDNA 片段连接到 pFLAG-CMV-3 载体,通过 EcoRI/BamHI 双酶切鉴定重组质粒。将重组表达体 pSFTSV-NSs-FLAG 导入 293 细胞中,共聚焦显微镜下观察 SFTSV-NSs 在细胞中的定位、Western Blot 检测 SFTSV-NSs 蛋白在 293 细胞中的表达情况。**结果** 成功克隆测序 SFTSV-NSs 基因;成功构建 SFTSV-NSs 真核表达载体 pSFTSV-NSs-FLAG,并将其转染到 293 细胞中。在 293 细胞中的表达检测结果显示共聚焦显微镜下观察重组体主要集中在细胞质中,并形成类包涵体样结构;且 Western Blot 检测结果显示 SFTSV-NSs 蛋白在 293 细胞中表达。**结论** 为进一步研究 SFTSV-NSs 基因的结构和功能以及病毒在感染细胞过程中与宿主的相互作用提供新思路。

关键词:新布尼亚病毒;载体构建;293 细胞;表达

中图分类号:R373.3,S852.65

文献标识码:A

文章编号:1002-2694(2020)04-0280-05

Construction and expression of eukaryotic expression vector of SFTSV

DOU Li-li, TAO Xiao-li, WANG Xiao-fang, LI Ting-ting, LI Yong-gang

(Department of Pathogenic Biology, School of Basic Medical Sciences,
Jinzhou Medical University, Jinzhou 121000, China)

Abstract: NSs protein is a non-structural protein encoded by Bunya virus S RNA and plays an important role in the replication cycle of Severe fever with thrombocytopenia syndrome bunyavirus(SFTSV). Therefore it is possible to explore the structure and function of the SFTSV-NSs gene and the interaction of the virus with the host during infection of the cell. To construct SFTSV-NSs eukaryotic expression vector pSFTSV-NSs-FLAG and transfet it into 293 cells, which lays a foundation for further study of the structure and function of SFTSV-NSs gene. The SFTSV-NSs gene sequence was amplified by RT-PCR and sequenced. The purified SFTSV-NSs cDNA fragment was ligated into pFLAG-CMV-3 vector, and the recombinant plasmid was identified by EcoRI/BamHI double digestion. The recombinant expression pSFTSV-NSs-FLAG was introduced into 293 cells. The localization of SFTSV-NSs in cells was observed under a confocal microscope. The expression of SFTSV-NSs protein in 293 cells was detected by Western Blot. The SFTSV-NSs gene was successfully cloned and sequenced. The SFTSV-NSs eukaryotic expression pSFTSV-NSs-FLAG was successfully constructed and transfected into 293 cells. The expression of the expression in 293 cells showed that the recombinant group was mainly concentrated in the cytoplasm and formed a type of inclusion body-like structure a under confocal microscope. Western Blot analysis showed that SFTSV-NSs protein was expressed in 293 cells. This study provides a new way to further study the structure and function of the SFTSV-NSs gene and the interaction of the virus with the host in the process of infecting cells.

Keywords: severe fever with thrombocytopenia syndrome bunyavirus(SFTSV);vector construction; 293 cells; expression

辽宁省科技厅自然科学基金项目(No.2015020340)

通讯作者:李永刚,Email:lygj@hotmai.com;

ORCID:0000-0002-3600-2994

作者单位:锦州医科大学基础医学院病原生物学教研室,锦州
121000

Supported by the Natural Science Fund Project of Liaoning
Provinial Science and Technology Department (No.
2015020340)

Corresponding author: Li Yong-gang, Email: lygj@ hotmai.
com

近年来,我国新发现了一种新型布尼亚病毒,经蜱传播,其临床表现主要为发热、血小板和白细胞减少、胃肠道症状以及淋巴结肿大,严重时还会引起器官衰竭,故将此病毒命名为发热伴血小板减少综合征布尼亚病毒,该病毒引起的疾病称为严重发热伴血小板减少症(SFTS),是一种人兽共患病^[1]。该病毒被世界卫生组织列为引起严重发热的最危险病原体,其死亡率为12%~30%,同时伴有特征性血小板减少症^[2]。然而,目前还没有针对此种病毒的抗病毒药物或者疫苗,另外该病毒在人类中的发病机制及病毒与宿主的相互作用在很大程度上仍未可知^[3]。布尼亚病毒是最大的动物病毒家族之一,大约有350种病毒,其中大多数是虫媒病毒,由节肢动物或啮齿动物传播。不同的布尼亚病毒感染者表现出一系列轻度至重度疾病,即发热性疾病,脑炎,出血热和急性呼吸道疾病^[1]。由于宿主的广泛性和物种的多样性,布尼亚病毒引起了广泛的关注。

研究表明,SFTSV-NSs是一个强的干扰素(IFN)拮抗剂,其可以阻断SFTSV感染细胞中IFN生成并且NSs是病毒毒力的主要决定因素^[4-9]。一些专家学者尝试产生缺乏NSs结构的缺陷型病毒以促进该发病机理的研究及开发新的候选疫苗,以防止这种重要的新兴病原体的传播。NSs在SFTSV病毒复制周期中具有重要作用,而该病毒在人类中的发病机制及病毒与宿主的相互作用仍不十分明确,本研究通过克隆SFTSV-NSs基因,构建其真核表达质粒以及检测其在细胞中的表达,为进一步研究SFTSV-NSs基因的结构和功能奠定基础。

1 材料与方法

1.1 主要材料与试剂

1.1.1 病毒与细胞 本实验所用的SFTSV由中国医学科学院微生物所馈赠,293细胞株购于北京协和医学院细胞中心。

1.1.2 主要试剂 内切酶Eco RI酶、Xho I酶(Thermo Scientific);反转录试剂盒、DH5 α 感受态细胞等(TaKaRa公司);TRIzol Reagent LS(Ambion);质粒DNA中量试剂盒(美国Axyprep公司);DMEM培养基、胎牛血清(美国Gibco公司);抗FLAG单克隆抗体(Sigma公司);Alexa Flour 594 goat anti-mouse IgG(H+L)、HRP-goat anti-mouse IgG(H+L)(Invitrogen公司)等。

1.2 SFTSV-NSs基因真核表达载体的构建

1.2.1 引物设计与合成 根据GenBank提供的SFTSV-NSs序列,运用Premier 5.0软件,进行引物

的设计。设计引物时,选取合适的酶切位点,设计真核表达重组质粒的引物见表1。

表1 新布尼亚病毒SFTSV-NSs基因真核表达引物

Tab.1 Ukrainian virus SFTSV-NSs gene eukaryotic expression primer

名称	序列	产物长度/bp
SFTSV-NSs R (Bam HI)	CGGGATCCTTAGACCTCCT- TCGGGAGGTCACCAATG	877
SFTSV-NSs F (Eco RI)	CGGGATCCTTAGACCTCCT- TCGGGAGGTCACCAATG	877

注:设计好的引物由大连宝生物公司合成,纯化级别为PAGE级。

1.2.2 SFTSV RNA的提取及SFTSV-NSs基因PCR扩增 SFTSV RNA按照Invitrogen公司的TRIzol Reagent LS试剂说明书进行的提取,后经反转录合成病毒cDNA。通过PCR扩增得SFTSV-NSs基因。PCR程序为94℃预变性5 min;94℃变性45 s,58℃退火45 s,72℃延伸65 s,扩增35个循环;72℃延伸10 min。PCR扩增产物通过0.8%琼脂糖凝胶电泳检测。

1.2.3 重组质粒pSFTSV-NSs-FLAG构建和鉴定 将PCR扩增产物进行通过纯化试剂盒进行纯化,并取适量PCR纯化产物送去公司测序。将纯化得到的SFTSV-NSs cDNA片段连接到pFLAG-CMV-3载体,将连接产物转化大肠杆菌DH5 α 感受态细胞选择生长良好的单克隆扩大培养后进行质粒中量提取,并用分光光度仪测定提取的质粒浓度,将提取的重组质粒用Eco RI/Bam HI进行双酶切鉴定。

1.3 pSFTSV-NSs-FLAG转染人肾上皮细胞293及相关检测

1.3.1 293细胞培养及转染 将293细胞以 4×10^5 /孔的密度接种到置有爬片的24孔板中,加入配好的含10%胎牛血清的高糖培养基置于37℃、5%CO₂培养箱中培养过夜。次日每孔用50 μL Opti-MEM稀释2 μL PEI转染试剂,轻轻吹吸3~5次混合均匀,室温放置5 min。用50 μL Opti-MEM稀释pSFTSV-NSs-FLAG质粒0.8 μg,同时稀释空载体pFLAG-CMV-3设置为对照组;将稀释好的质粒与空载体分别加入到PEI稀释液中,室温放置20 min。将混合液逐滴加入到24孔板中,置于37℃细胞培养箱中培养48 h。分别进行间接免疫荧光及Western Blot检测。

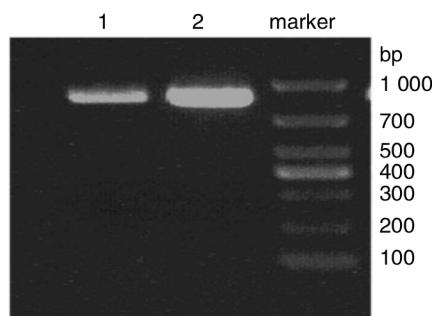
1.3.2 免疫荧光检测 293细胞转染pSFTSV-

NSs-FLAG 质粒 48 h 后,用 4% 多聚甲醛固定液固定 1 h, PBS 洗涤 3 次。然后 0.1% Triton X-100 打孔 10 min,用 PBS 洗涤 3 次后再加入含 2% FBS 的 PBS 封闭液,4 ℃ 封闭 2 h。用 PBS 洗涤 3 次后加入小鼠抗 FLAG 抗体,37 ℃ 孵育 1 h。吸掉一抗稀释液,用 PBS 洗涤 3 次,加入二抗 Alexa Flour 594 goat anti-mouse IgG (H+L),37 ℃ 孵育 1 h, PBS 洗涤 3 次,每孔加入 100 μL DAPI 溶液室温孵育 5 min, PBS 洗涤 3 次,用甘油进行封片,共聚焦显微镜下观察。

1.3.3 Western blot 检测重组质粒转染的 293 细胞中 SFTSV-NSs 蛋白表达 用细胞裂解液 NP-40 提取转染后 293 细胞的总蛋白,加入 4×蛋白上样缓冲液置于沸水浴中加热 10 min 进行蛋白变性,所得样本收集置于 -20 ℃ 冻存备用。蛋白样品回收后转膜,5% 脱脂奶粉封闭 2 h; 将小鼠抗 FLAG 抗体用 1:5 000 比例稀释,4 ℃ 摆床孵育过夜; 然后用洗膜液 5 min/次洗膜 3 次。再以 1:3 000 的比例稀释 HRP-goat anti-mouse IgG (H+L) 作为二抗,室温摇床孵育 1 h,再用洗膜液 5 min/次洗膜 3 次。最后用化学发光法分别检测 PVDF 膜上 SFTSV-NSs 蛋白的表达。

2 结 果

2.1 SFTSV-NSs 基因扩增序列测定 PCR 扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。结果如图 1,在 877 bp 左右有条带,与预期 SFTSV-NSs 基因大小一致,因此判断 SFTSV-NSs 真核表达基因扩增成功,且条带单一,可以进行 PCR 产物纯化。



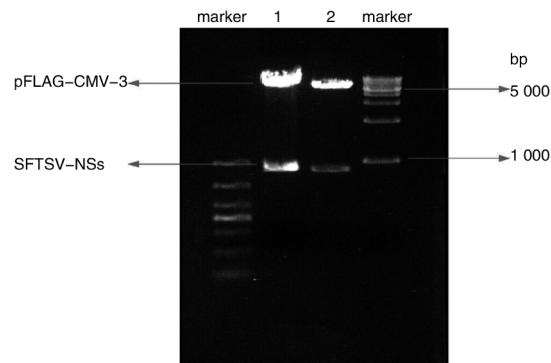
注:1 和 2 均为 SFTSV-NSs 目的片段

图 1 SFTSV-NSs 基因 PCR 产物电泳结果

Fig.1 SFTSV-NSs gene PCR product electrophoresis results

2.2 重组质粒构建及测序鉴定 用 EcoRI/BamHI 双酶切真核 PCR 纯化产物和空载体 pFLAG-CMV-

3 质粒,回收目的片段并连接,用 EcoRI/BamHI 双酶切鉴定。电泳显示有和预期大小一致的酶切片段,证明 pSFTSV-NSs-FLAG 质粒构建成功,见图 2。

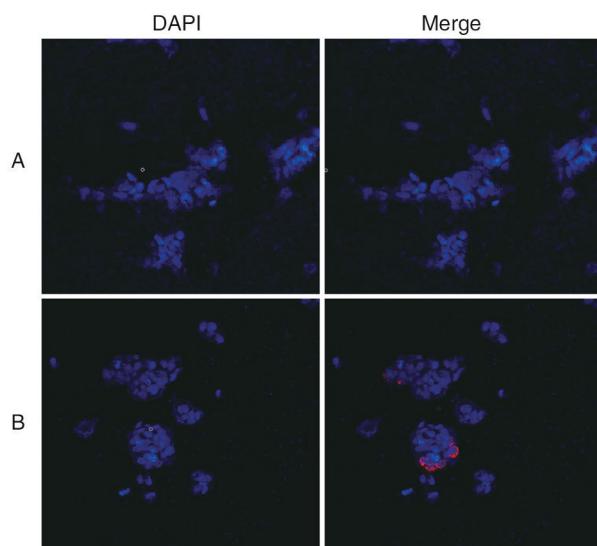


注:1 和 2 均为 pSFTSV-NSs-FLAG 质粒

图 2 EcoRI/BamHI 双酶切 pSFTSV-NSs-FLAG 质粒

Fig.2 EcoRI/BamHI double digestion of pSFTSV-NSs-FLAG plasmid

2.3 免疫荧光检测 SFTSV-NSs 基因在 293 细胞中的定位 pSFTSV-NSs-FLAG 转染至 293 细胞中,以抗 FLAG 标签的单克隆抗体为一抗进行间接免疫荧光检测。结果如图 3 所示,转染的 293 细胞质内检测到荧光聚集的类包涵体样结构,但细胞核内无表达;而转染 pFLAG-CMV-3 空载体的细胞未检测到荧光标记。

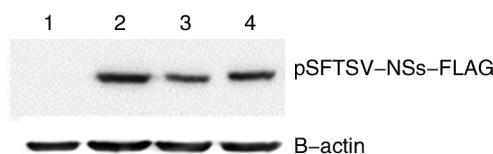


注:A 为转染空载体 pFLAG-CMV-3; B 为转染重组质粒 pSFTSV-NSs-FLAG

图 3 pSFTSV-NSs-FLAG 转染细胞间接免疫荧光检测 (200×)

Fig.3 Indirect immunofluorescence detection of pSFTSV-NSs-FLAG transfected cells (200×)

2.4 Western blot 鉴定目的蛋白在 293 细胞中的表达 pSFTSV-NSs-FLAG 转染至 293 细胞中, Western Blot 检测结果如图 4 所示。由图可见 pSFTSV-NSs-FLAG 转染后的细胞提取总蛋白的泳道中在约 33 kD 处有特异性条带出现,与 SFTSV-NSs 蛋白预期大小一致,而转染空载体 pFLAG-CMV-3 的泳道则没有条带。



注:1 为转染空载体;2-4 为转染 pSFTSV-NSs-FLAG 质粒

图 4 pSFTSV-NSs-FLAG 转染细胞 Western Blot 检测
Fig.4 pSFTSV-NSs-FLAG transfected cells were detected by Western Blot

3 讨 论

布尼亚病毒之所以种类繁多,是由于其基因组的分节段特性,利于病毒发生基因重排和基因重组,既可对变化的环境获得适应性突变,也可快速产生新病毒,增加致病性。基因重排和基因重组本质上增大了布尼亚病毒对宿主的危害,为布尼亚病毒诊断、预防及控制加大了难度,从而对人类公共卫生造成了更大的威胁^[10-12]。因此,对重要的布尼亚病毒要求进行深入研究,探究其遗传机制、传播机制及驱动基因重排的机理,从而为此类病毒的预防与控制提供理论基础。

SFTSV 属于布尼亚病毒科白蛉病毒属,为分节段的负链 RNA 病毒,病毒颗粒呈球形,直径 80~100 nm,由厚度 5~7 nm 的脂质双层覆盖,其表面有棘突。与其他白蛉属病毒类似,SFTSV 基因组分为 L、M、S 3 个片段,S 片段编码核蛋白(NP)和非结构蛋白(NSs)^[13]。Brennan B 等^[14]发现 SFTSV 病毒致病性的增强是由于 NSs 对先天免疫反应的拮抗作用,并且他们进一步证实编码 NSs 核苷酸序列的某些部分对于重组病毒的回收可能是至关重要的。在体内环境中,SFTSV-NSs 拮抗 IFN 反应的能力可能限于 I 型干扰素诱导和信号传导。NSs 蛋白可以在感染和转染的细胞中形成病毒样结构(VLS),受感染细胞中的结构蛋白可能与病毒 RNA 相互作用^[15]。本研究通过转染构建的病毒重组质粒,经免疫荧光检测也观察到类包涵体样结构,与其研究结果一致。以上数据表明 NSs 也可能在病毒复制中发挥重要作用^[17]。另外,有研究表明,NSs

蛋白可能在病毒复制中发挥重要作用,但具体作用机制尚不清楚。本研究通过构建 SFTSV-NSs 真核表达体 pSFTSV-NSs-FLAG 并将其转染 293 细胞,进而通过研究重组质粒在细胞中的表达情况,为进一步研究 SFTSV-NSs 基因的结构和功能奠定基础,以期为研究 SFTSV 在感染细胞过程中与宿主的相互作用提供新思路。

利益冲突:无

引用本文格式:窦丽丽,陶晓莉,王晓芳,等.新布尼亚病毒真核表达载体的构建及表达[J].中国人兽共患病学报,2020,36(4):280-284. DOI:10.3969/j.issn.1002-2694.2020.00.042

参 考 文 献:

- [1] Yadav PD, Chabal GY, Shete AM, et al. A mini-review of Bunyaviruses recorded in India[J]. Indian J Med Res, 2017, 145(5):601-610. DOI:10.4103/ijmr.IJMR_1871_15
- [2] Yu XJ, Liang MF, Zhang SY, et al. Fever with thrombocytopenia associated with a novel bunyavirus in China[J]. N Engl J Med, 2011, 364(16):1523-1532. DOI:10.1056/NEJMoa1010095
- [3] Huang D, Jiang Y, Liu X, et al. A cluster of symptomatic and asymptomatic infections of severe fever with thrombocytopenia syndrome caused by person-to-person transmission[J]. Am J Trop Med Hyg, 2017, 97(2):396-402. DOI:10.4269/ajtmh.17-0059
- [4] Zhan J, Wang Q, Cheng J, et al. Current status of severe fever with thrombocytopenia syndrome in China[J]. Virol Sin, 2017, 32(1):51-62. DOI:10.1016/j.coviro.2018.03.005
- [5] Takahashi T, Maeda K, Suzuki T, et al. The first identification and retrospective study of severe fever with thrombocytopenia syndrome in Japan[J]. J Infect Dis, 2013, 209(6):816-827. DOI:10.1093/infdis/jit603
- [6] Lee SH, Kim HJ, Byun JW, et al. Molecular detection and phylogenetic analysis of severe fever with thrombocytopenia syndrome virus in shelter dogs and cats in The Republic of Korea [J]. Ticks Tick Borne Dis, 2017, 8(4):626-630. DOI:10.1016/j.ttbdis.2017.04.008
- [7] Kim KH, Ko MK, Kim N, et al. Seroprevalence of severe fever with thrombocytopenia syndrome in Southeastern Korea, 2015 [J]. J Korean Med Sci, 2017, 32(1):29-32. DOI:10.3346/jkms.2017.32.1.29
- [8] 吴慧,张云智.发热伴血小板减少综合征布尼亚病毒的研究进展[J].中国热带医学,2017,17(2):198-202. DOI:10.13604/j.cnki.46-1064/r.2017.02.24
- [9] Sun Y, Qi Y, Liu C, et al. Nonmuscle myosin heavy chain IIA is a critical factor contributing to the efficiency of early infection of severe fever with thrombocytopenia syndrome virus[J]. J Virol, 2014, 88(1):237-248. DOI:10.1128/JVI.02141-13
- [10] Nunes MRT, de Souza WM, Sayji N, et al. Oropouche or thobunyavirus: Genetic characterization of full-length genomes

- and development of molecular methods to discriminate natural reassortments[J]. Infect Genet Evol, 2019, 68:16-22. DOI: 10.1016/j.meegid.2018.11.020
- [11] Dunlop JI, Szemiel AM, Navarro A, et al. Development of reverse genetics systems and investigation of host response antagonism and reassortment potential for Cache Valley and Kai-ri viruses, two emerging orthobunyaviruses of the Americas [J]. PLoS Negl Trop Dis, 2018, 12(10):e0006884. DOI: 10.1371/journal.pntd.0006884
- [12] Byrd BD, Williams CJ, Staples JE, et al. Notes from the Field: Spatially Associated Coincident and Noncoincident Cases of La Crosse Encephalitis—North Carolina, 2002–2017[J]. MMWR Morb Mortal Wkly Rep, 2018, 67(39):1104-1105. DOI: 10.15585/mmwr.mm6739a8
- [13] Li D. A highly pathogenic new bunyavirus emerged in China [J]. Emerg Microbes Infect, 2013, 2(1):e1. DOI: 10.1038/emi.2013.1
- [14] Brennan B, Rezelj VV, Elliott RM. Mapping of transcription termination within the S segment of SFTS phlebovirus facilitated generation of NSs deletant viruses[J]. J Virol, 2017, 91(16):e00743-17. DOI: 10.1128/JVI.00743-17
- [15] Wu X, Qi X, Liang M, et al. Roles of viroplasm-like structures formed by nonstructural protein NSs in infection with severe fever with thrombocytopenia syndrome virus[J]. FASEB J, 2014, 28(6):2504-2516. DOI: 10.1096/fj.13-243857
- [16] Lei XY, Liu MM, Yu XJ. Severe fever with thrombocytopenia syndrome and its pathogen SFTSV[J]. Microbes Infect, 2015, 17(2):149-154. DOI: 10.1016/j.micinf.2014.12.002

收稿日期:2019-09-19 编辑:王晓欢

关于著作权事项

1. 作者对来稿的真实性及科学性负责。依照《中华人民共和国著作权法》有关规定,本刊可对来稿做文字修改、删节。凡有涉及原意的修改,则提请作者考虑。修改稿逾期2个月未修回者,视作自动撤稿。

2. 来稿一经接受,作者亲笔签署本刊《版权转让协议》后,论文的专有使用权即归《中国人兽共患病学报》所有;本刊有权以电子期刊、光盘版、APP终端、微信等其他方式出版刊登论文,未经本刊同意,该论文的任何部分不得转载他处。

3. 文章在投稿后如作者顺序、个数如需变动,需提交全体作者同意修改说明,并附有全体作者亲笔签名及单位盖章。如修回后,经编辑部修改即在中国知网做论文首发,此时不允许修改作者及作者单位。

相关事宜请联系本刊编辑部:福州市津泰路76号《中国人兽共患病学报》编辑部

邮政编码:350001,电话:0591-87552018/87563582,Email:rsghb@vip.sina.com。